

sammensetzung der Lipide in der anämischen Nekrose begründet sein, in der sich präexistente mit Ab- und Umbausubstanzen in unterschiedlichem Verhältnis durchmischen. Erst die Anwendung der Dünnschichtchromatographie mit der Möglichkeit zur Trennung von Glyceriden, freien Fettsäuren, Cholesterin und seinen Estern (10) bot einen Ansatz, im Anschluß an die Identifizierung von Ab- und Umbaulipiden diese aus dem Chromatogramm zurückzugewinnen und die so isolierten Substanzen näher zu charakterisieren (4). Neben Fettsäuren als Abbaulipiden, die zusätzlich zu den bei der Autolyse nachgewiesenen auftreten, handelt es sich in erster Linie um Triglyceride und Cholesterinester; die beiden letzten bezeichnet man als „Umbaulipide“. Diese drei Substanzgruppen lassen sich in allen untersuchten Herden verschiedenen Alters (ein Tag bis mehrere Monate) in recht unterschiedlicher Menge auffinden.

Die gaschromatographische und UV-spektrophotometrische Analyse der FFS und der (sekundär) glycerid- und cholesterinestergelassenen Fettsäuren ergab einige bemerkenswerte Befunde, deren wichtigster die Polyensäuren und die Lignocerinsäure betrifft (6). Polyensäuren

treten in freier und wiederveresterter Form bereits in einem frischen von Fettkörnchenzellen freien Herd auf. Lignocerinsäure erscheint erst, wenn Makrophagen gebildet sind. In einer 5 Wochen alten Nekrose sind Polyensäuren stark vermindert, Lignocerinsäure ist so gut wie vollständig geschwunden. Da wie bereits dargestellt im Gehirn Polyensäuren nur aus Glycerinphosphatiden stammen, Lignocerinsäure dagegen nahezu ausschließlich aus Sphingolipiden, muß geschlossen werden, daß die letztgenannten nur in Gegenwart von Makrophagen, Phosphatide aber wie erwartet auch bei Abwesenheit derselben gespalten werden können. Die starke Abnahme bzw. der Schwund der betreffenden Säuren in der älteren Nekrose kann nur durch eine Kettenverkürzung bzw. einen vollständigen Abbau erklärt werden. Für die Kettenverkürzung spricht die Tatsache, daß sich innerhalb der Ab- und Umbaufettsäuren synchron zur Abnahme der Polyensäuren und der Lignocerinsäure ein Anstieg der Stearin- und Ölsäure nachweisen läßt. Ob zusätzlich zur Kettenverkürzung der C₂₀- bis C₂₄-Säuren eine Hydrierung der hochungesättigten Komponenten erfolgt, hat sich noch nicht klären lassen.

Literatur

1. LINDLAR, F., *Naturwissenschaften* 49, 543 (1962). — 2. MASSHOFF, W., F. LINDLAR und H. J. STOLPMANN, *Virchows Arch. path. Anat.* 337, 340 (1964). — 3. LINDLAR, F. und I. A. ZAKI, *Virchows Arch. path. Anat.* 341, 142 (1966). — 4. LINDLAR, F. und R. GÜTTLER, *Acta neuropath. (Berlin)* 6, 349 (1966). — 5. KLENK, E. und F. LINDLAR, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 299, 74 (1955). — 6. LINDLAR, F. und F. LORENZ, *Acta neuropath. (Berlin)*, im Druck. — 7. ROSSITER, R. J. in K. A. C. ELLIOT, I. H. PAGE und J. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Thomas, Springfield, Ill. (1955). — 8. JATZKÉWITZ, H. und E. MEHL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 329, 264 (1962). — 9. SCHMIDT, J., *Diss. München* (1965). — 10. MANGOLD, H. K. und N. TUNA, *Federat. Proc.* 20, 268 (1961).

Priv.-Doz. Dr. F. Lindlar

1 Berlin 19, Spandauer Damm 130

Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

II. Mitteilung: Anwendung der Methode bei Plasmaanalysen¹⁾

Von L. TREIBER, W. RINDT und G. W. OERTEL

Aus der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. v. Friedberg)

(Eingegangen am 20. Juni 1966)

Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon, freies Ätiocholanolon und Progesteron können in Plasmaextrakten mittels der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktion als Endpunktbestimmung quantitativ nachgewiesen werden. Eine Dünnschichtchromatographie der freien, bzw. der aus Konjugaten freigesetzten Steroide, sowie der entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazone sorgt für die Spezifität der einzelnen Verfahren, die bei einer Richtigkeit um 80% und einer Genauigkeit von rund 6–10% die Erfassung von 0,1–0,2 µg Steroid gestatten. Die Ergebnisse, die im Verlauf der Analyse von 5–10 ml Plasma erzielt wurden, entsprechen denjenigen anderer, bewährter Methoden.

Dehydroepiandrosterone, androsterone and etiocholanolone, free etiocholanolone and progesterone can be assayed in plasma extract by means of the 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction as an end point determination. Thin layer chromatography of the free steroids, those liberated from conjugates, and the 2,4-dinitrophenylhydrazones ensures the specificity of the individual methods, which at an accuracy of approximately 80% and a precision of 6–10% allows the estimation of 0,1–0,2 µg steroid. Results obtained by the analysis of 5–10 ml plasma agree with those obtained from other qualified procedures.

Wie aus der vorangegangenen Mitteilung (1) zu erkennen ist, läßt sich die Reaktion von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin für die quantitative Bestimmung derartiger Verbindungen erfolgreich benutzen. Die empfindliche Farbreaktion, die bei Ver-

¹⁾ Vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.

wendung von Mikroküvetten den Nachweis von beinahe 0,1 µg Mono-ketosteroid gestattet, sollte daher die Analyse solcher Steroide erleichtern, die im Untersuchungsmaterial nur in niedrigen Konzentrationen vorhanden sind, oder aber die Erfassung gesuchter Ketosteroide in geringen Volumina des jeweiligen Ausgangsmaterials erleichtern. Nachstehende Untersuchungen be-

fassen sich mit der *Anwendung* der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktion zur Bestimmung von einzelnen 17-Ketosteroiden, von freiem Ätiocholanolon und Progesteron in Plasma.

Methodik und Ergebnisse

Bestimmung von Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon in Plasma

Extraktion freier und konjugierter Steroide

Da die Konzentration freier 17-Ketosteroide im Plasma von Normalpersonen 1–2 µg nicht übersteigt — gegenüber 50–250 µg/100 ml an sulfokonjugierten 17-Ketosteroiden —, kann in den meisten Fällen auf die Fraktion der freien Steroide verzichtet werden, die somit für eine Bestimmung von freien Corticosteroiden zur Verfügung steht. Man extrahiert daher 5 ml heparinisiertes Plasma einmal mit 25 ml und einmal mit 10 ml eiskaltem Methylenchlorid durch 30 Sek. langes Schütteln. Die vereinigten Extrakte werden mit 5 ml 0,1N Natronlauge und 5 ml Wasser gewaschen und der fluorimetrischen Analyse der 11-Hydroxycorticosteroide (2) zugeführt.

Zur Gewinnung der gesamten Steroidkonjugate schüttelt man das präextrahierte Plasma mit 6 Vol. Äthanol-Aceton (1:1 v/v), saugt nach 30 Min. bei 37° vom ausgefallenen Eiweiß ab und dampft das Filtrat mit einem Rotationsverdampfer bei 35–40° zur vollständigen Trockene ein. Der Rückstand wird in 2 ml Äthanol aufgenommen, mit 2 ml Aceton versetzt und erneut zur Trockene gebracht.

Spaltung der Konjugate

Der Rückstand wird in 5 ml 0,01N Perchlorsäure in Äthylacetat gelöst. 1 Std. bei 45–50° bebrütet und die Lösung unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Anschließend löst man in 3 ml 1-proz. KOH in Äthanol, läßt 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen und verdünnt mit 12 ml Wasser. Für die Extraktion der freigesetzten Steroide werden 2 mal je 15 ml Benzol-Hexan (1:1 v/v) benutzt. Die vereinigten Extrakte werden sodann zur Trockene eingedampft.

Entfernung von Lipoiden

Der Trockenrückstand wird zusammen mit etwa 250 mg Kieselgel (Fa. Merck) in 3 ml 70-proz. Methanol suspendiert und unter gelegentlichem Umschütteln mindestens 1 Std. auf –15° gekühlt. Man zentrifugiert die Suspension in der Kühlzentrifuge 10 Min. bei 5000 U./Min., dekantiert und wäscht mit 2 ml eiskaltem 70-proz. Methanol nach. Die völlig farblose Lösung wird schließlich mit 20 ml Äthanol-Benzol (1:1 v/v) versetzt und unter Stickstoff zur Trockene eingedampft.

Dünnschichtchromatographie der freien Steroide

Die freigesetzten Steroide werden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 v/v) (4) oder auf Aluminiumoxyd G im Lösungsmittelsystem Äther-Äthylacetat (1:1 v/v) (5) vorgereinigt. Anhand der entsprechenden Standardverbindungen lassen sich die Zonen mit den gesuchten 17-Ketosteroiden festlegen. Man eluiert die Abschnitte mit 5 ml abs. Äthanol, filtriert die Lösung gegebenenfalls durch Filter der Firmen Whatmann (Nr. 42) oder Macherey u. Nagel (Nr. 640 md) und dampft unter Stickstoff bei 35–40° zur Trockene ein.

Farbreaktion

Der Rückstand der einzelnen Fraktionen wird mit 0,5 ml 0,01-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat unter Stickstoff bei 35–40° zur vollständigen Trockene gebracht, bevor man in 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol aufnimmt und nach 30 Min. bei Zimmertemperatur im Stickstoffstrom zur Trockene eindampft.

Dünnschichtchromatographie der 2,4-Dinitrophenylhydrazone

Den in wenig Chloroform gelösten Rückstand der einzelnen Fraktionen, sowie eines Reagenzienleerwertes überführt man auf eine 0,3 mm dicke Dünnschicht aus aktiviertem Kieselgel G, wobei

die Lösung strichförmig (1–2 cm) aufzutragen ist. Zu beiden Seiten der Proben und des Leerwertes werden jeweils 5 µg der gesuchten 2,4-Dinitrophenylhydrazone als Standardverbindungen aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms geschieht vorzugsweise im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 v/v). Die den Standardverbindungen entsprechenden Zonen werden wie üblich (6) abgesaugt und zweimal mit je 5 ml Chloroform eluiert. In gleicher Weise bereitet man sich für die anschließende Photometrie notwendige Leereeluats. Alle Lösungen werden unter Stickstoff bei 35–40° zur Trockene eingedampft.

Photometrie

Zur quantitativen Messung wird der Rückstand von Proben und Reagenzienleerwert in 3 ml (1) Chloroform gelöst und bei 335, 370 und 405 mµ photometriert. Nach Korrektur der maximalen Absorption gemäß der Formel

$$\text{Abs}_{370 \text{ kor.}} = 2 \times \text{Abs}_{370} - \text{Abs}_{335} - \text{Abs}_{405}$$

errechnet sich die Konzentration an vorhandenem Steroid-2,4-Dinitrophenylhydrazon aus der korrigierten Absorption der jeweiligen Standardverbindung, wobei die notwendige Eichkurve statt mit 0,1–10 µg Androsteron auch mit 0,1–10 µg Cyclopentanon, bzw. den daraus erhältlichen Derivaten aufgestellt werden kann.

Zuverlässigkeitskriterien

Zehn Wiederauffindungsversuche mit je 5 µg Dehydroepiandrosteron, 2 µg Androsteron und 1 µg Ätiocholanolon in 5 ml Sammelplasma führten zum Nachweis von 3,42–4,11 µg (Mittel 3,79 µg) Dehydroepiandrosteron, 1,20–1,64 µg (Mittel 1,46 µg) Androsteron und 0,61–0,90 µg (Mittel 0,72 µg) Ätiocholanolon (Tab.2). Zehn gleichartige Versuche unter Verwendung von 5-proz. Albuminlösung erbrachten eine Wiederauffindungsrate von 79% Dehydroepiandrosteron, 82% Androsteron und 80% Ätiocholanolon. Im Verlauf dieser Analysen fand man eine Abweichung der Einzelwerte um ± 6,2% für Dehydroepiandrosteron, ± 7,5% für Androsteron und ± 9,7% für Ätiocholanolon, sodaß *Richtigkeit* und *Genauigkeit* des Verfahrens als ausreichend gelten können. Die *Empfindlichkeit* der Methode, die auf dem molaren Extinktionskoeffizienten von Mono-ketosteroid-2,4-Dinitrophenylhydrazonen ($\epsilon = 22500$) beruht, liegt bei 0,2–0,25 µg. Dünnschichtchromatographie der freien Steroide und der entsprechenden Derivate (Abb. 1) bedingen die *Spezifität* der Methode.

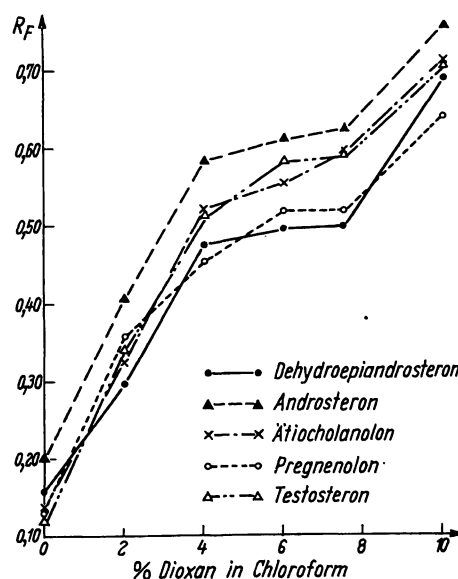


Abb. 1

R_F-Werte der 2,4-Dinitrophenylhydrazone verschiedener Steroide bei Dünnschichtchromatographie in Chloroform mit steigendem Dioxangehalt

Tab. 1

Einzel- und Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (s) der Plasmaspiegel in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ für Dehydroepiandrosteron („DHEA“), Androsteron („ANDRO“), Ätiocholanolon („ETIO“) und freies Ätiocholanolon von männlichen (m) und weiblichen (w) Normalpersonen, sowie für Progesteron („PRO“) normaler Schwangerer im 3. Trimenon. Die Einzelwerte sind auf- bzw. abgerundet

	DHEA		ANDRO		ETIO		freies ETIO	PRO
	m	w	m	w	m	w	m/w	w
	49	34	16	12	3	3	0,52	11,4
	51	37	17	13	5	4	0,67	13,6
	66	42	18	14	6	6	0,72	14,1
	69	57	18	15	7	7	0,78	15,0
	70	62	20	15	10	8	0,86	15,7
	73	65	22	17	12	8	0,95	15,7
	74	75	25	20	12	9	1,12	15,9
	83	88	29	22	13	10	1,26	16,1
	147	90	31	25	15	12		16,5
	168	110	34	27	17	13		17,4
								18,7
								19,6
M	85	66	23	18	10	8	0,86	15,8
s	34,2	24,8	6,4	5,2	4,6	3,2	0,24	2,22

Tab. 2

Einzel- und Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (s) bei Wiederauffindungsversuchen im Plasma. Werte in μg

	DHEA 5 μg	ANDRO 2 μg	ETIO 1 μg	freies ETIO		PRO 1 μg	PRO 0,2 μg
				1 μg	0,2 μg		
	3,42	1,20	0,61	0,75	0,13	0,735	0,140
	3,60	1,35	0,64	0,76	0,14	0,740	0,142
	3,70	1,40	0,67	0,77	0,14	0,745	0,147
	3,75	1,44	0,69	0,78	0,14	0,752	0,147
	3,78	1,46	0,71	0,79	0,15	0,760	0,149
	3,80	1,47	0,71	0,80	0,15	0,782	0,153
	3,84	1,51	0,74	0,81	0,15	0,800	0,156
	3,89	1,55	0,74	0,81	0,15	0,808	0,156
	4,01	1,58	0,79	0,81	0,15	0,812	0,158
	4,11	1,64	0,90	0,82	0,15	0,814	0,158
				0,83	0,15	0,817	0,159
				0,84	0,16	0,820	0,161
				0,85	0,16	0,820	0,161
				0,86	0,16	0,832	0,165
				0,87	0,17	0,840	0,167
						0,844	0,159
						0,853	0,168
						0,860	0,172
						0,879	0,174
						0,893	0,175
M	3,79	1,46	0,72	0,81	0,15	0,810	0,158
s	0,196	0,125	0,082	0,036	0,010	0,0459	0,0103

Ergebnisse

Im peripheren Plasma von 10 gesunden Männern (19–42 Jahre) fanden sich Konzentrationen von 49–168 μg (Mittel 85 μg) Dehydroepiandrosteron, 16–34 μg (Mittel 23 μg) Androsteron und 3–17 μg (Mittel 10 μg) Ätiocholanolon pro 100 ml, während im Plasma gesunder Frauen 34–110 μg (Mittel 66 μg) Dehydroepiandrosteron, 12–27 μg (Mittel 18 μg) Androsteron und 3–13 μg (Mittel 8 μg) Ätiocholanolon pro 100 ml nachzuweisen waren (Tab. 1). Diese Werte stimmen weitgehend mit Angaben anderer Untersucher (7, 8) und früheren Ergebnissen (9) überein. Die statistische Auswertung der einzelnen Kollektive legt die Vermutung nahe, daß insbesondere für Dehydroepiandrosteron eine asymmetrische Verteilung vorliegt, wie man sie auch bei der täglichen Ausscheidung von 17-ketogenen Steroiden findet (10).

Bestimmung von freiem Ätiocholanolon in Plasma

Extraktion freier Steroide

10–20 ml heparinisiertes Plasma werden mit 0,5 Vol. 0,25N Natronlauge verdünnt und 2mal mit je 1 Vol. Methylchlorid-Äther (1:4 v/v) extrahiert (11). Die vereinigten Extrakte wäscht man mit 0,2 Vol. Wasser, trocknet über Natriumsulfat und dampft unter Stickstoff bei 35–40° zur Trockene ein.

Weiterverarbeitung

Dünnschichtchromatographie der freien Steroide, Farbreaktion unter Verwendung von 0,2 ml 0,01-proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin und 1,0 ml 0,03-proz. Trichloressigsäure in abs. Benzol, Dünnschichtchromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons und Photometrie erfolgten wie oben beschrieben (12).

Zuverlässigkeitskriterien

Bei je 15 Wiederauffindungsversuchen mit 0,2 und 1,0 μg Ätiocholanolon in 10 ml Sammelpasma, welches 0,32 μg Ätiocholanolon/

100 ml enthielt, konnten $0,15 \pm 0,020$ bzw. $0,81 \pm 0,072$ μg zugesetzten Steroids nachgewiesen werden (Tab. 2), so daß *Richtigkeit* (75 bzw. 81%) und *Genauigkeit* ($\pm 13,3$ bzw. $\pm 8,9\%$) des Verfahrens als ausreichend anzusehen sind. Die *Empfindlichkeit*, gegeben durch den molaren Extinktionskoeffizienten und das Volumen der Endlösung, liegt bei 0,1 μg . Was die *Spezifität* der Methode anbetrifft, so wird diese durch Dünnschichtchromatographie der freien Steroide und der Derivate gewährleistet. Sie läßt sich durch erneute (oder sogar wiederholte) Dünnschichtchromatographie des Derivats, z. B. im Lösungsmittelsystem Chloroform-Äthanol (19:1 v/v), steigern, die ohne nennenswerte Verluste letzte, das Absorptionsmaximum verschiebende Verunreinigungen entfernt.

Ergebnisse

Im Plasma von 8 Normalpersonen fand man 0,52–1,26 μg Ätiocholanolon pro 100 ml (Tab. 1), wogegen bei Vorliegen des sog. „Steroidfiebers“ (13) Konzentrationen bis zu 23 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ gemessen wurden.

Bestimmung von Progesteron in Plasma

Extraktion freier Steroide

10–20 ml heparinisiertes Plasma werden wie bei der Bestimmung von freiem Ätiocholanolon extrahiert und die vereinigten Extrakte entsprechend behandelt.

Dünnschichtchromatographie der freien Steroide

Den Trockenrückstand überführt man mittels wenig Methanol/Äther (1:1 v/v) quantitativ auf eine 0,3 mm dicke Schicht aus aktiviertem Kieselgel G. Zu beiden Seiten der Probe (n) werden jeweils 10 μg Progesteron als Standard aufgetragen. Die aufsteigende Entwicklung erfolgt im Lösungsmittelsystem Benzol-Äthanol (4:1 v/v) (4). Anhand der UV-Absorption des Standards

wird der Progesteron enthaltende Abschnitt festgelegt und nach Desaktivieren über Wasserdampf das abgesaugte Kieselgel 2mal mit je 5 ml Äthanol eluiert. Von einem Leerchromatogramm wird schließlich ein entsprechender Leerwert hergestellt und wie die Probe weiter behandelt.

Dünnschichtchromatographie des Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazons

Die Farbreaktion erfolgt wie bei der Bestimmung von freiem Ätiocholanolon. Probe und Reagenzienleerwert werden auf Kieselgel-G im Lösungsmittelsystem Chloroform-Dioxan (94:6 v/v) oder Benzol-Äthanol (4:1 v/v) aufsteigend chromatographiert. Anhand der R_F -Werte des zu beiden Seiten laufenden Standards von je 5–10 μg Progesteron-bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon ($R_F = 0,78$ bzw. $0,81$) legt man die entsprechenden Chromatogrammschnitte von Probe und Reagenzienleerwert fest, eluiert wie oben und dampft die Eluate zur Trockene ein.

Photometrie

Der Rückstand wird in 1 ml Chloroform aufgenommen und die Absorption der Probe gegen den Leerwert bei 350, 385 und 420 m μ gemessen. Aus der korrigierten Absorption bei 385 m μ

$$\text{Abs}_{385 \text{ kor.}} = 2 \times \text{Abs}_{385} - \text{Abs}_{350} - \text{Abs}_{420}$$

und einer mit 0,1–5,0 μg Progesteron in sinngemäßer Weise aufgestellten Eichkurve, bzw. der korrigierten Absorption von 1 μg Progesteron-Standard als Derivat kann die Konzentration der Probe an freiem Progesteron ermittelt werden.

Zuverlässigkeitskriterien

Im Verlauf von je 20 Wiederauffindungsversuchen mit 0,2 und 1,0 μg Progesteron in 10 ml Sammelplasma gesunder Männer ließen sich $0,158 \pm 0,0206$ bzw. $0,810 \pm 0,0918$ μg zugegebenen Progesterons in den Endlösungen feststellen (Tab. 2). Die Richtigkeit der Analysen lag somit bei 79 bzw. 81%, die Genauigkeit bei $\pm 13,0$ bzw. $\pm 11,3\%$. Hinsichtlich der Empfindlichkeit konnte 0,1 μg Progesteron mit ausreichender Genauigkeit nachgewiesen werden. Die Spezifität der Methode ergibt sich aus der Dünnschichtchromatographie des freien Progesterons und seines Derivates. Um gelegentlich auftretende und das Absorptionsmaximum beeinträchtigende Verunreinigungen völlig auszuschließen, kann das gebildete Progesteron-bis-2,4-dinitrophenylhydrazon einer zweiten Dünnschichtchromatographie in Benzol-Äthanol (4:1 v/v) oder Benzol-Dioxan (4:1 v/v) ($R_F = 0,74$) unterworfen werden.

Ergebnisse

Im Plasma gesunder Schwangerer im letzten Trimenon betrug die Konzentration freien Progesterons 11,4–19,6 μg / 100 ml mit einem Durchschnitt von 15,8 μg / 100 ml (Tab. 1).

Diskussion

Gegenüber den herkömmlichen Endpunktbestimmungen bei Analyse von einzelnen 17-Ketosteroiden oder von Progesteron im Plasma, die zumeist auf der Zimmermann-Reaktion (14) beruhen, bzw. sich der UV-Absorption oder der Fluorometrie (15) bedienen, bietet die Anwendung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktion deutliche Vorteile. Im Vergleich mit der Zimmermann-Reaktion ermöglicht letztere Endpunktbestimmung eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit solcher Analysenverfahren, beträgt doch der molare Extinktionskoeffizient eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons von Mono-17-ketosteroiden bereits rund 23000 gegenüber etwa 7000 des Chromogenextraktes bei der üblichen Zimmermann-Reaktion. Die größere Empfindlichkeit aber erlaubt eine Reduzierung des erforderlichen Ausgangsmaterials und damit Serienuntersuchungen. Wenngleich die Zimmermann-Reaktion auf der anderen Seite auch in Gegenwart von Fremdstoffen zur Bildung eines leicht

extrahierbaren Chromogens führt und eine bei Steroiden spezifische Gruppenreaktion darstellt, so ist die zeitlich begrenzte Beständigkeit des Chromogens als weiterer Nachteil anzusehen. Das intensiv gefärbte 2,4-Dinitrophenylhydrazon kann hingegen beliebig oft chromatographiert werden, was wiederum der Spezifität zugute kommt. Des weiteren gelingt eine bessere Trennung der hier untersuchten 11-Desoxy-17-ketosteroiden: Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon durch Dünnschichtchromatographie, wenn diese Steroide als 2,4-Dinitrophenylhydrazone vorliegen. Die im Verlauf der Farbreaktion entstehenden Nebenprodukte, sowie überschüssiges Reagenz lassen sich bei entsprechender Wahl der Lösungsmittelsysteme leicht entfernen. Versuche, diese störenden Fremdstoffe durch Behandlung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone in Chloroform- oder Benzollösung mit alkalischem Permanganat (16) oder Benedicts-Reagenz (17) auszuschließen, erbrachten zwar eine weitgehende Verringerung unerwünschter Begleitsubstanzen, zugleich aber auch merkliche Verluste an 2,4-Dinitrophenylhydrazon, so daß der dünn-schichtchromatographischen Reinigung der Vorzug gegeben wurde.

Da die hier beschriebenen Methoden sich von anderen Analysenverfahren nur durch die Endpunktbestimmung unterscheiden, Extraktion, Hydrolyse, Reinigung und Vortrennung der freien Steroide dagegen in hinlänglich bewährter Weise durchgeführt wurden, waren ähnliche Ergebnisse zu erwarten, die sich in gleichwertigen Zuverlässigkeitskriterien widerspiegeln sollten. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit genügen bereits 5 ml Plasma für eine zuverlässige Bestimmung von Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon. Die Dünnschichtchromatographie von freiem Steroid und Derivat, die eine einwandfreie Trennung der genannten Verbindungen erlaubt, bedeutet gleichzeitig eine merkliche Zeitersparnis gegenüber papierchromatographischen Verfahren. Für die Erfassung des normalerweise nur in Spuren vorkommenden freien Ätiochanolons sind allerdings mindestens 10 ml Plasma notwendig. Desgleichen benötigt man zur Bestimmung von freiem Progesteron in Schwangerenplasma im allgemeinen 10 ml Ausgangsmaterial.

Ob die Empfindlichkeit der Methode trotz des relativ hohen molaren Extinktionskoeffizienten von über 50000 ausreicht, um Progesteron in vertretbaren Volumina Normalplasma quantitativ nachzuweisen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Erste Experimente, auftretende Verluste durch Zugabe von ^3H -markiertem Steroid festzustellen und auszugleichen, bestätigen die in den Zuverlässigkeitskriterien ausgedrückten Verluste. Eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit, vor allem für die Bestimmungsmethode von Progesteron und Testosteron im Plasma, ist vom Einsatz ^{14}C -markierten 2,4-Dinitrophenylhydrazins zu erwarten. Vorläufige diesbezügliche Untersuchungen zur Entwicklung einer doppelten Isotopenverdünnungsmethode deuten auf eine Empfindlichkeit, die derjenigen anderer gängiger Verfahren ebenbürtig ist.

Literatur

1. TREIBER, L. und G. W. OERTEL, diese Z., 5, 83 (1967). — 2. BETHGE, H., W. WINKELMANN und H. ZIMMERMANN, Klin. Wschr. 43, 1274 (1965). — 3. DE PAOLI, J. C., E. NISHIZAWA und K. B. EIK-NES, J. Clin. Endocr., Springfield 23, 81 (1963). — 4. LISBOA, B. P., Acta endocr. K'hn. 43, 47 (1963). — 5. HAMMAN, B. L. und M. M. MARTIN, J. Clin. Endocr., Springfield 24, 1195 (1964). — 6. OERTEL, G. W. und K. GROOT, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 11, 512 (1965). — 7. CONRAD, S., V. B. MAHESH und W. HERRMANN, J. clin. Invest. 40, 947 (1961). — 8. SANDBERG, D. H., N. AHMAD, M. ZACHMAN und W. W. CLEVELAND, Steroids 6, 777 (1965). — 9. OERTEL, G. W. und E. KAISER, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 7, 221 (1962). — 10. RINDT, W., Acta endocr. K'hn. 50, 403 (1965). — 11. SOMMERVILLE, I. F. und G. N. DESHPANDE, J. Clin. Endocr., Springfield 18, 1223 (1958). — 12. TREIBER, L., W. RINDT und G. W. OERTEL, J. Chromatogr. (Amsterdam), im Druck. — 13. BONDY, P. K., G. I. COHN und P. G. GREGORY, Medicine, Baltimore 44, 249 (1965). — 14. ZIMMERMANN, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 233, 251 (1935). — 15. SHORT, R. V. und I. LEVETT, J. Endocr. 25, 239 (1962). — 16. STUPNICKI, R. und E. STUPNICKA, J. Chromatogr. (Amsterdam) 9, 235 (1962). — 17. REICH, H., K. F. CRANE und S. J. SANFILIPPO, J. biol. Chemistry 198, 713 (1952); J. org. Chemistry 18, 822 (1953).

Dozent Dr. G. W. Oertel
65 Mainz, Langenbeckstraße 1

Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren und Aminen im Stuhl

Von F. TANCREDI¹⁾ und H.-CH. CURTIUS

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. A. Prader)

(Eingegangen am 13. Juli 1966)

Es wird eine dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung der Aminosäuren und Amine im Stuhl in Form ihrer DNP-Derivate beschrieben. Die Methode gestattet eine einfache Abtrennung der Störsubstanzen und eine getrennte Bestimmung von Aminosäuren und Aminen. Bei den untersuchten Normalfällen war das Spektrum an Aminosäuren und Aminen relativ einheitlich. Die Hauptmenge der Stuhlamino-säuren besteht aus ätherlöslichen; im säurelöslichen Extrakt fanden wir bei den von uns untersuchten Stühlen praktisch nur Arginin, Taurin, Cysteinsäure und ausnahmsweise Histidin. Die Hauptmenge der Stuhlamine besteht aus Putrescin und Cadaverin.

A thin layer chromatographic method is described for the determination of faecal amino acids and amines as their DNP-derivatives. There is a simple separation from interfering substances, followed by the separate measurement of amino acids and amines. In normal cases, the pattern of amino acids and amines was relatively uniform. The majority of the faecal amino acids are ether-soluble; in the acid-soluble extract of the faeces studied, we found practically only arginine, taurine, cysteic acid, while histidine was an exception. Putrescine and cadaverine are the chief faecal amines.

Über die im Stuhl vorhandenen Aminosäuren und Amine liegen nur wenige Arbeiten vor (1, 2, 3). Grundsätzlich können für deren Untersuchung die gleichen Methoden in Betracht gezogen werden wie bei anderem biologischen Material, z. B. Urin (4, 5, 6). Der Stuhl ist ein unhomogenes Material, das große Mengen von verschiedenen Substanzen enthält, wie Eiweiße, Fette, Kohlenhydrate, Pigmente, Cellulose, anorganische Salze usw. Diese Stoffe müssen vor der Chromatographie abgetrennt werden. Zu diesem Zweck eignet sich die Dünnschichtchromatographie der DNP-Aminosäuren vorzüglich. Bei diesem Verfahren werden die Aminosäuren und Amine in die entsprechenden wasserunlöslichen DNP-Derivate überführt und anschließend aus dem wäßrigen Milieu extrahiert. Nach Abtrennung von den festen Bestandteilen und Extraktion sollte es auch beim Stuhl möglich sein, die Aminosäuren, Peptide und Amine in ihrer dinitrophenylierten Form zu erfassen. Für die Dinitrophenylierung und dünnschichtchromatographische Auftrennung der äther- und säurelöslichen DNP-Derivate haben WALZ und Mitarbeiter (8) sowie für die säurelöslichen auch BÜRGI und Mitarbeiter (9) Arbeitsvorschriften bekanntgegeben. Diese Methoden wurden der vorliegenden Arbeit teilweise zugrunde gelegt. Die Amine wurden im Dioxan-Wasser-Gemisch

nach MCINTIRE und Mitarbeitern (10) dinitrophenyliert und anschließend in einem Fließmittelsystem nach PATAKI (11) chromatographiert.

Methodik

Geräte

Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie der Fa. Desaga, Heidelberg (Chromatographieplatten 20×20 cm).
Schüttelwasserbad (Arbeitstemperatur 60°).
Rotationsverdampfer der Fa. Büchi, Flawil
Trockenschrank (Arbeitstemperatur 110°).
Homogenisator der Fa. Silverson, London.

Chemikalien

2,4-Dinitrofluorbenzol, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 53567; Putrescin, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 52777; Cadaverin, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 52820; Aceton, Fa. Merck, Art.-Nr. 14; Ammoniak 2,5-proz., Fa. Merck, Art.-Nr. 5432; Äthanol, Fa. Merck, Art.-Nr. 90972; Äthylacetat, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 53848; Benzylalkohol, Fa. Merck, Art.-Nr. 981; Benzol, Fa. Merck, Art.-Nr. 91783; n-Butanol, Fa. Merck, Art.-Nr. 988; 2-Chloräthanol, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 52005; Chloroform, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 52219; Dioxan, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 53609; Eisessig, Fa. Merck, Art.-Nr. 90058; Methanol, Fa. Merck, Art.-Nr. 6006; Natriumsulfat wasserfrei, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 56083; Natriumhydrogencarbonat, Fa. Merck, Art.-Nr. 6323; Natriumhydroxyd, Fa. Fluka, Art.-Nr. A 56051; Pyridin, Fa. Merck, Art.-Nr. 7461; Toluol, Fa. Merck, Art.-Nr. 98323; Tetrachloräthan, Fa. Fluka, Art.-Nr. 57512; Salzsäure, Fa. Merck, Art.-Nr. 312; Kongopapier-Phenolphthaleinpapier; Kieselgel G nach Stahl, Fa. Merck, Art.-Nr. 7731.

¹⁾ Stipendiat der Roche-Studienstiftung.